

官庁出願
特許願 (II)
後記号なし
昭和50年 7月 4日

特許庁長官 殿

1.発明の名称 高純度マルトースの製造方法

2.発明者

住所 千葉県千葉市稲毛東5丁目8番1号
氏名 工業技術院微生物工業技術研究所内
高崎義幸

3.特許出願人

住所 東京都千代田区鍛錬1丁目3番1号
氏名 (114) 工業技術院長
松本敬信

4.指定代理人

住所 千葉県千葉市稲毛東5丁目8番1号
氏名 工業技術院微生物工業技術研究所長
御園光信

方
式
審
査

明細書

1.発明の名称

高純度マルトースの製造方法

2.特許請求の範囲

澱粉または液化澱粉を β -アミラーゼと α -1,6-グルコンダーゼで処理し、次にアスペルギルス属の生産する α -アミラーゼで処理することを特徴とする高純度マルトースの製造方法。

3.発明の詳細な説明

本発明は澱粉から純度の高いマルトースを製造する方法に関するものである。

従来、澱粉からマルトースを製造するには、液化澱粉を β -アミラーゼ及び α -1,6-グルコンダーゼで処理すればよいことはよく知られている。

そして、ここに使用する β -アミラーゼ(α -1,4-グルカンマルトヒドロラーゼ)は、麦芽、大豆に多く見出され、現在、工業的には、これら糖原のものが使用されているが、バチルス属細菌も同様の酵素を生産することが知られている。すなわち、1946年ニーンらは、バチルス・ポリミ

⑯ 日本国特許庁

公開特許公報

⑯特開昭 52-7487

⑯公開日 昭52(1977)1.20

⑯特願昭 50-82595

⑯出願日 昭50(1975)7.4

審査請求 未請求 (全6頁)

内整理番号

711049

⑯日本分類

360D23/

⑯Int.C12

C12D 13/00

キサ(*Bacillus polymyxa*)が、 β -アミラーゼを生産することを発見し〔アーカイブ・オブ・バイオケミストリー(*Archive of Biochemistry*)第10巻、第41頁(1946年)〕、また、1948年、ローズは、同菌株の生産する β -アミラーゼの酵素的性質について、より詳細に報告している〔アーカイブ・オブ・バイオケミストリー(*Archive of Biochemistry*)第16巻、第349頁(1948年)〕。その後、東原、岡田らも、バチルス・メガテリウムが β -アミラーゼを生産することを報告している〔日本農芸化学会、昭和46年度大会講演要旨集第212頁、およびアミラーゼシンポジウム、第6巻、第39頁(1971)〕が、この酵素もバチルス・ポリミキサの生産する β -アミラーゼと同じであることが報告されている(日本農芸化学会、昭和47年度大会講演要旨集第86頁)。

一方、ここに使用する α -1,6-グルコンダーゼについては、従来イソアミラーゼ、ブルラーゼとして多くの報告がある。即ち、イソアミラーゼ

セは、丸尾、小林らにより酵母（丸尾文治、小林恒夫、日本農芸化学会誌、第23巻、第115頁および第120頁（1949年）など）はじめて見出され、その後、高粱等植物（R-酵素とよばれている）やシュードモナス属細菌（特公昭45-16788）にも見出されている。更に最近、好熱性バチルス・ステアロサモフイラスが、65～67.5°Cに最適作用温度を有する高温度性イソアミラーゼを生産することが報告されている。（日本農芸化学会大会昭和47年度講演要旨集第88頁および特開昭48-91272）。また、ブルラナーゼは、1959年、ベンダーによつてブルラリヤブルランの生産する多糖類ブルランを加水分解する酵素として、エーロバクター・エーロゲネス（*Aerobacter aerogenes*）に見出され、ブルランの α -1,6グリコシド結合を加水分解してマルトリオースを生成する〔*Biochem. Biophys. Acta*、第36巻、第309頁（1959年）、および特公昭46-7559〕。この酵素はアミロベクチンやグリコーゲンなどの α -1,6グリコシド結合も

特開昭52-7487 (2)
分解する。その後、このような酵素は、エセリン・インターメディア〔上田他、*Applied Microbiology*、第15巻、第492頁（1967）〕やストレプトマイセス・ミテス〔上田他、*Journal of Fermentation Technology*、第49巻、第552頁（1971年）〕などの微生物によつても生産されることが報告されている。

このように、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを別々に生産することは多くの文献に報告されているが、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産する微生物については全く報告されていない。

本発明者は、先に、マルトースの生産性を高めるために、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産させることができれば、これを複合酵素として分離し、マルトースの生産にきわめて有用な酵素になり得るとの見地から、 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産することのできる糖を求めて探索したところ、バチルス属に属するものと認められる一菌株が β -

アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを同時に生産し、かつこの α -1,6-グルコシダーゼは全く新らしい酵素であることを見出したのである。

そして、本発明者は、ここに見出したバチルス菌が同時に生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを用いてマルトースの生産の研究を進めたところ、生成するマルトースにかなりの量でオリゴ糖が混在してその純度を低下せしめている問題に遭遇したのである。即ち、このバチルス属細菌の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを液化度の低い糖粉（DE3以下）に作用させると、液化度10%以上の高濃度反応においても88～90%の極めて高い収量でマルトースを得ることができるが、残る10～12%のうち、マルトリオースなどの三糖類が5～7%、三糖類より上のオリゴ糖が2～5%の量で未分解物として残り、そしてグルコースはわずか0～0.2%であることが明らかとなつたのである。このような三糖類以上のオリゴ糖が多量混在すれば、マルトースの結晶化は阻害され、ひいてはマ

ルトースの商品価値を低下せしめることになる。その理由について明らかではないが、現在、これは本発明で使用するバチルス菌の生産する β -アミラーゼのマルトリオースの分解活性が小さく、またマルトリオースの加水分解がマルトースによって拮抗的に阻害されること、および本発明で使用する β -アミラーゼおよび α -1,6-グルコシダーゼがいずれも exo 型の加水分解模式をとるためであろう考えられるのである。

そこで、本発明者はこのマルトリオースとオリゴ糖を高濃度のマルトースの存在下でもマルトースに効果的に加水分解する酵素の検索をおこなつた結果、アスペルギルス・オリーゼ（*Aspergillus oryzae*）などのアスペルギルス属菌の生産する α -アミラーゼ、例えばタカアミラーゼAが極めて特異的に作用し、ほぼ理論的収量でマルトースが得られることがわかつた。そして、バチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*）の液化型 α -アミラーゼや好熱性バチルス菌の生産する耐熱性 α -アミラーゼ（大和化成製サモア

ミラーゼやノボリ製サミル)やその他の微生物、動物、植物起源の α -アミラーゼでは効果が認められないことも明らかとなつた。第1段は液化糖粉をバチルス・セレウス・バリエータス・ミコイデス (Bacillus cereus var. mycoides) の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼで加水分解して得られた糖液の糖組成と、これを一旦加熱処理して酵素を失活させてのち、アスペルギルス・オリーゼの α -アミラーゼ、バチルス・ズブチルスの α -アミラーゼ、好熱性バチルス菌の生産する α -アミラーゼで処理した反応液の糖組成を示している。表から明らかな様にアスペルギルス・オリーゼの α -アミラーゼで処理することによりマルトオリースおよびオリゴ糖が効率的に加水分解され、マルトースの収量が4~6%増加し、94~95%の理論的収量で得られることがわかつた。

第 1 表

処理	α -アミラーゼの種類	グルコース		マルトース		三糖類より上	
		(%)(a)	(%)(b)	(%)(c)	(%)(d)	(%)(e)	(%)(f)
対照 (未処理)	α -アミラーゼ	0.1	87.2	7.6	5.1		
	アスペルギルス α -アミラーゼ (タカアミラーゼ A)	4.9	94.1	0.4	0.7		
	バチルス・ズブチルス α -アミラーゼ	1.0	87.5	8.0	3.7		
	好熱性バチルス α -アミラーゼ (サモアミラーゼ)	0.3	87.4	8.7	3.6		

本発明は、これら知見にもとづいてなされたものである。

すなわち、本発明は糖粉または液化糖粉をバチルス菌の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼで処理してのち、アスペルギルス菌の生産する α -アミラーゼで処理することを特徴とするマルトースの製造方法に関するものである。

アスペルギルス菌 α -アミラーゼによる処理は、糖化液に残存する酵素(バチルス菌 β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼ)を失活させておこうのが望ましい。

本発明において使用されるバチルス菌細胞の生産する β -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼは以下に示す様な酵素的性質を有する。

A. 本発明により生産される β -アミラーゼの理化学的性質：

(1) 作用：糖粉、アミロース、アミロベクチン、グリコーゲン、デキストリン、ブルランなどをマルトースを生成する。

(2) 基質特異性：アミロースに対する分解はほぼ

100%、糖粉に対する分解率はほぼ60%である。

しかし、アミロベクチン、グリコーゲン、デキストリン、ブルランなどを含まれる α -1,6-グルコシンド結合を分解することはできない。

- (3) 作用pH範囲：pH 3~10
- (4) 最適作用pH：pH 7付近
- (5) 作用温度：約65°Cまで
- (6) 最適作用温度：約50°C
- (7) 失活：55°C、10分間の加熱で約20%失活し、70°C、10分間の加熱でほぼ完全に失活する。本酵素はpH 6~10の酸性側よりも、むしろアルカリ性側で安定である。
- (8) 耐害：本酵素はp-クロロマーキュリベンゾエートで阻害されるが、モノヨード酢酸による阻害は少ない。p-クロロマーキュリベンゾエートによる失活は、システインの添加により回復

1,6結合を分解する。

(2) 基質特異性：本酵素は、ブルランの α -1,6-グルコシド結合を加水分解してマルトトリオースを生成するが、アミロベクチンやグリコーゲンに作用させても灰度反応の増加は認められない。したがつて、本酵素はアミロベクチンが β -アミラーゼ(α -1,4-グルカンマルトヒドロラーゼ)によつてある程度加水分解され、側鎖が短くなつたものに作用すると考えられる。しかし、イソマルトースに対する作用は認められない。

(3) 作用 pH範囲： $\text{pH } 5 \sim 10$ (4) 最適作用pH範囲： $\text{pH } 6 \sim 6.5$ (5) 作用温度：約 65°C まで(6) 最適作用温度：約 50°C

(7) 失活：本酵素は 50°C 、10分間の加熱で約50%失活し、 65°C 、10分間の加熱ではほぼ完全に失活する。しか

復する。本酵素は Cu^{++} 、 Hg^{++} 、 Ag^{+} によつても強く阻害される。また、 Pb^{++} によつても阻害される。

(9) 精製方法：培養液から、硫酸30～50%飽和で沈殿する区分として分離され、このあとセファアデツクスG-100カラムクロマトグラフィーにより高度に精製された該酵素を得ることができる。

(10) 力価測定法：2%可溶性澱粉を含む0.1Mリソ酸緩衝液($\text{pH } 7.0$)2mLに適量の酵素液を加え、蒸溜水で全量4mLとし、 40°C で反応させた。

この条件で、反応時間1時間および反応液1mL当たり、1mgのマルトースを生成する酵素量を1単位とした。

B. 本発明により生産される α -1,6-グルコシターゼの理化学的性質：

(1) 作用： β -アミラーゼの作用によつてある程度分解されたアミロベクチンの α

し、 Ca^{++} 、あるいは Sr^{++} は強い保護作用があり、 Ca^{++} が存在しないときは、 50°C 、30分間の加熱で、約90%失活するが、 5×10^{-5} の CaCl_2 が存在したときは殆んど失活が認められない。

(8) 安定pH：本酵素の安定pHはほぼ $\text{pH } 7$ の間にあり酸性側で不安定で、アルカリ側で比較的安定である。

(9) 阻害：本酵素は、p-クロロマーキュリベンゾエートによつて阻害されるが、モノヨード酢酸によつては殆んど阻害されない。p-クロロマーキュリベンゾエートによる阻害はシスティンの添加により回復する。本酵素は Hg^{++} 、 Ag^{+} によつては強く阻害され、また Pb^{++} によつても阻害される。

(10) 精製方法：本酵素は培養液から、硫酸60～70%飽和で沈殿区分として分離され、このあとセファアデツクスクロマ

トグラフィーにより高度に精製された該酵素を得ることができる。

(1) 力価測定法：本酵素の活性測定は、本酵素がブルランに作用して、マルトトリオースを生成するところから、ブルランを基質とする下記の反応条件により活性を測定した。

1%ブルランを含む0.1Mリソ酸緩衝液($\text{pH } 7.0$)0.5mLに、適量の酵素液を加え、蒸溜水で全量1.0mLとし、 40°C で1時間反応させた。

この条件で1mgのマルトトリオースを生成する酵素量を1単位とした。

以上の理化学的性質、特に基質特異性から、本酵素は従来知られているイソアミラーゼやブルランアーゼのいずれにも分類されないバチルス属の生産する新規な α -1,6-グルコシダーゼと認められるものである。

上記酵素を生産するのに使用する菌は、バチルス属に属する β -アミラーゼ及び α -1,6-グル

コシダーゼ同時生産菌であるが、その例示菌としては、先に分離されたバチルス・セレウス・ヴァリエータス・ミコイデス FERM-P No. 2391をあげることができる。その菌学的性質は次に示される。

バチルス・セレウス・ヴァリエータス・ミコイデス FERM-P No. 2391の菌学的性質、

(1) 形態 菌體 ($0.9 \sim 1.4 \mu \times 2.0 \sim 4.5 \mu$)

培養初期は主として長鎖で、カビまたは放線菌の菌糸のもつれたような形態をとり、培養中期および終期には短鎖状のものが多くなる。非運動性、鞭毛なし、孢子ノウのはつきりしたふくらみは認められない。グラム陽性。

(2) 肉汁液体培養、生育良好、沈降、こん湯および菌塊の形成認められない。

(3) 肉汁寒天斜面培養、生育良好、乱糸状に生育、乳白色。

(4) グルコース・アスパラギン寒天培養、生育よくない。乱糸状に生育。

(5) グルコース・ナイトレース寒天培養、生育しないか、わずか生育。

(6) 最適生育温度、30～37°C

最高生育温度、41～45°C

死滅温度、100°C、10分間加熱しても死滅しない。

以上の菌学的性質について、バージェーのマニュアル・オブ・デタミネーティブ・バクテリオロジー第7版を参照し、バチルス・セレウス・ヴァリエータス・ミコイデス (*Bacillus cereus* var. *mycoides*) と同定されるべき微生物であることを認めた。そして、本菌株は筑工研菌寄第2391号として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

このほか、バチルス・スペシス YT-No. 1002 およびバチルス・スペシス YT-No. 1003 も使用することができる。

上記の α -アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを用いて澱粉を加水分解するには、次の様にしておこなわれる。

澱粉濃度が低い場合には澱粉をそのまま糊化して使用できるが、高濃度の澱粉濃度で反応をおこ

(6) チロシン寒天斜面培養、生育良好、乱糸状、わずか褐色。

(7) クエン酸の利用、陽性。

(8) ミルク溶脳、ペプトン化。

(9) ポテト培養、生育良好、乳白色またはわずか褐色。

(10) ゼラチン、液化する。

(11) アセチルメチルカルビノールの生産、陽性

(12) 硝酸塩の還元、陽性

(13) カタラーゼ反応、陽性

(14) インドールの生産、陽性

(15) 濃粉の加水分解、陽性

(16) アンモニアの生成、陽性

(17) 硫化水素の生成、陽性

(18) 食塩肉汁、食塩4%以上で生育しない。

(19) 炭水化物の利用、グルコース、マンノース、マルトース、トレハロース、澱粉、グリコーゲンを利用し、生成する。ガスの生成なし。

シュクロース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イヌリンも利用する。

なうには、澱粉を物理的または酸、酵素を使用する化学的方法で部分的に加水分解して液化澱粉を調製し、これに上記のバチルス菌の生産する α -アミラーゼおよび α -1,6-グルコシダーゼを添加して、pH 5.5～7、温度 45°C～55°C で反応をおこなう。

反応終了後の糖液は通常これを一旦加熱処理して酶酵素を失活させてのち、アスペルギルス属の α -アミラーゼを添加し、pH 5～7、温度 45°C～60°C で反応をおこなう。あるいは活性炭など適当な吸着剤またはイオン交換体などに吸着不溶化した酵素を用いて連続的に処理する。

ここに用いるアスペルギルス属の α -アミラーゼは、アスペルギルス・オリーゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オクラセウス、アスペルギルス・ウサミ等アスペルギルス属の菌の生産する α -アミラーゼであればいかなるものでも三糖類以上のオリゴ糖をマルトースとグルコースに分解する能力を有している。

次に実施例により本発明の詳細を説明する。

实施例 1

ミルクカゼイン 2 %、可溶性糖粉 0.5 %、
 K_2HPO_4 0.3 %、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 %、 $CaCl_2$
 5×10^{-4} モルからなる培地 IC、バチス・セレウ
ス・バリエータス・ミコイデス（微研菌第
2391号）を接種し、30°Cで通気培養して β -
アミラーゼと α -1,6-グルコシダーゼを生産し、
醣分画とケイソウ土吸着溶出法により両酵素を
分割した。可溶性糖粉（DE 1.5）10 g IC、上
記バチス菌 β -アミラーゼ約3000単位と α -
1,6-グルコシダーゼ約300単位を加え全量100
mlとし pH 6~6.5、温度 50°Cで反応させた。反
応終了後（115時間目）、培液組成を分析した結果、マルトース 88.5 %、マルトオリースなど
三糖類 7.6 % 三糖類以上のオリゴ糖 3.8 %、グル
コース 0.1 % であった。

この糖液の一部 10 ml を 100°C で 5 分間加熱して酵素を熱失活させ、冷却後アスペルギルス・オーリーゼの α -アミラーゼ（三共製薬、タカアミラーゼ A）300 単位を加え、50°C で 20 時間反

1,4結合以外の結合)のある糖であると思われる。
 なお、糖化終了後の糖化液を加熱処理しないで、
 バチス糖-アミラーゼと α -1,6-グルコシ-
 ダーゼの存在下でアスペルギルス・オリーゼのβ-
 アミラーゼで処理した場合の糖组成は、マルト-
 ース90.5%, グルコース2.0%, 三糖類4.2%
 と三糖より上のオリゴ糖5.3%であつた。

実施例2

可溶性糊粉 (DE 1.5) 1.8%、寒天 1% より得られたバチルス菌 α -アミラーゼ 300 単位と α -1,6-グルコシダーゼ 30 単位を加え、全量 1.0% にして、pH 6 ~ 6.5、温度 50 °C で反応させた。2 日時間反応後、マルトースとしての分解率が 9.6% に達してのち、アスベルギルス菌 α -アミラーゼ (三共製薬、タカアミラーゼ A) 300 単位を加え、同じ条件で反応させた。反応終了後、糖組成を分析した結果、マルトース 9.1%、グルコース 3.1%、三糖類 2.1%、三糖類より上のオリゴ糖 3.1% であつた。

第 2 表

応させた。そして糖組成を分析した結果、第2換に配す通りであつた。

糖組成		アスペルギルス・オリーゼンロードアミラーゼにより
	処理をしたもの	処理をしていないもの
グルコース	4.7	0.1
マルトース	94.2	88.5
三糖類	0.4	7.6
三糖類より上のオリゴ糖	0.7	3.8

ここで、アスペルギルス属の α -アミラーゼ1単位は、可溶性澱粉を基質とし、pH 5.5、温度37℃で1分間に $1 \mu\text{M}$ のマルトースを生成する酵素量と定義した。

この段から明らかに、マルトトリオースおよびオリゴ糖は効果的に分解され、糖化液のマルトース含量は 9.4.2% であつた。残存する三糖類および三糖類より上のオリゴ糖は、いずれも 1% 以下であつた。これらの糖はいずれも分岐 (α -

5. 附付書類の目録

(1) 明細書 1通
~~明細書~~ 8字削除
(2) 梨客帳本 1通

PREPARATION OF HIGH-PURITY MALTOSE

Publication Number: 52-007487 (JP 52007487 A), January 20, 1977

Inventors:

- TAKASAKI YOSHIYUKI

Applicants

- AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (A Japanese Government or Municipal Agency), JP (Japan)

Application Number: 50-082595 (JP 7582595), July 04, 1975

International Class (IPC Edition 2):

- C12D-013/00

JAPIO Class:

- 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY--- Microorganism Industry)

JAPIO Keywords:

- R113 (CHEMISTRY--- Pullulam Polysaccharides)

Abstract:

PURPOSE: High-purity maltose is obtained in high yield by glucolized starch with enzymes produced by bacillus, followed by decomposition of maltotriose and oligomaltose in siad glucolized starch. (From: *Patent Abstracts of Japan*, Section: C, Section No. 12, Vol. 01, No. 48, Pg. 141, May 11, 1977)

JAPIO

© 2004 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.

Dialog® File Number 347 Accession Number 048487